

日本淡水産プラナリアの染色体研究

Ⅱ. ナミウズムシ (*Dugesia japonica*) の核型分析

加 藤 文 裕 白 井 眞由実

(武庫川女子大学文学部教育学科)

Chromosome Studies in Japanese

Fresh-Water Planarian

Ⅱ. Karyotype Analyses of Namiuzumushi

(*Dugesia japonica*)

Fumihiko Kato and Mayumi Shirai

Department of Education

Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663, Japan

Karyotype analyses were carried out by air-drying method in Namiuzumushi (*Dugesia japonica*) collected from various districts in Japan: Kiyosato, Kai-Oizumi, and Kai-Koizumi (Yamanashi Prefecture); Kasuga-Taisha (Nara Prefecture); Ryusenkyo and Chihayagawa (Osaka Prefecture); Sakasegawa and Rokko (Hyogo Prefecture); and Kawakamikyō (Saga Prefecture).

Three chromosome groups were included in *Dugesia japonica*: (1) chromosome number $2n=16$ group; (2) chromosome number $3n=24$ group; and (3) chromosome number $25+\alpha$ group. It was confirmed that $3n=24$ was derived from $2n=16$ and transformed into $25+\alpha$.

At present, *Dugesia japonica* groups are classified into two sub-species⁷: one is *Dugesia japonica japonica* and the other is *Dugesia japonica ryukyuensis*. We have proposed to reexamine the taxonomy in this species.

手代木 (1987)¹によると、プラナリアは現在地球上で約35属、およそ380種が知られ、このうち日本には6属20数種が生息している。ナミウズムシ (*Dugesia japonica*) は極東地域に広く分布している最も普通種の淡水産プラナリアで、染色体数はすべて $2n=16$ とされていた (手代木・板垣, 1965)²。しかし、産地によって体色、形態、生理、生態などに差異がみられることから、我々は各地で採集したナミウズムシについて“エアドライ法”による染色体調査をおこない、染色体数 $2n=16$ 以外に、杉野 (1959,³ 1971⁴) が以前か

ら“九州型”とか“平地型”とか“汚水性”の虫と呼んでいた一群のナミウズムシのなかに、染色体数が25の虫がいることを発見し、染色体を基準にした分類の検討を提唱した (杉野ら, 1973)⁵。

これを契機としてナミウズムシの染色体研究が盛んになり、数種の染色体変異体が見つかった: 例えば、1個体に染色体数16と24が混在するもの (沖・田村, 1975)⁶; 染色体数14と他の染色体が混在するもの、染色体数25と26が混在するもの (Kawakatsu *et al.*, 1976)⁷; 染色体数 $2n=16$ と26と27の3種が混在するもの (Kato, 1980)⁸; そして染色体数 $3n=24$ (Kato *et al.*, 1989)⁹ などである。これらの変異体のうち沖根

県浦添市で採集されたとされる染色体数14を基本とする虫は亜種として *Dugesia japonica ryukyuensis* に分類されたが、その他の虫は基本型の $2n=16$ の虫とともに包括して *Dugesia japonica japonica* に分類されている (Kawakatsu *et al.*, 1976)⁷。

我々は細胞遺伝学の立場からプラナリアの分類を再検討するため、各地で採集した虫について正確な核型分析をおこなっているが、この度ナミウズムシの鮮明

な染色体標本が得られたので、核型分析の結果を報告するとともに分類学への資料を提供する。

材料および方法

材料 実験に供したナミウズムシの採集地、採集年月および体長を Table 1 に示し、各地域 1 例の虫像を Fig. 1 に示す。

山梨県清里産は超大型で黒色の有性系の虫である。

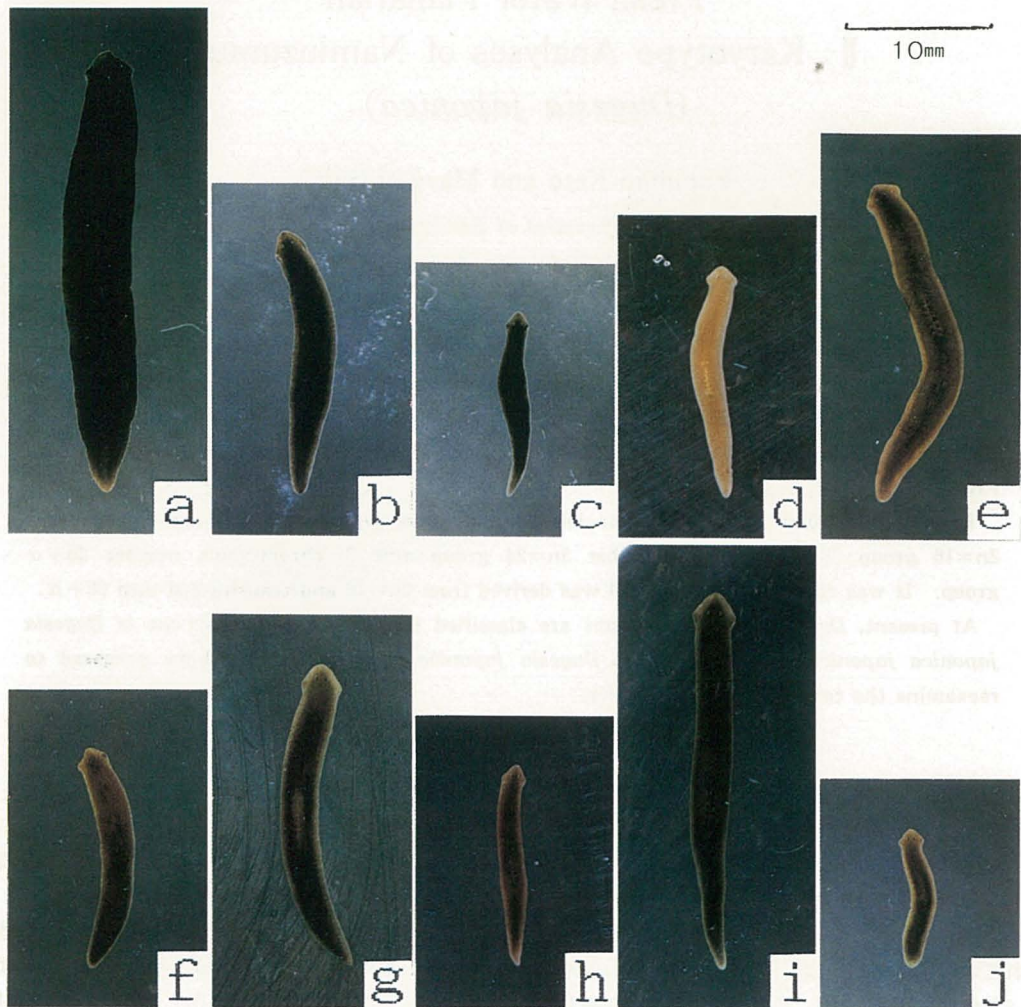


Fig. 1 Specimens of *Dugesia japonica*. a: Sexual type from Kiyosato. b: Asexual type from Kai-Oizumi. c: Sexual type from Kai-Koizumi. d: Asexual type from Kasuga-Taisha. e: Sexual type from Ryusenkyo. f: Asexual type from Ryusenkyo. g: Sexual type from Chihayagawa. h: Asexual type from Sakasagawa. i: Asexual type from Rokko. j: Asexual type from Kawakamikyo.

1973年の染色体調査⁵以来、当研究室では清里産の染色体をブラナリアの標準染色体にしてきたが、観光開発で川の汚染が進むにつれて生息数が減少し、採集して持ち帰っても雑菌感染で全滅するので、清里産の調査は今回が最後になるかも知れない。

山梨県甲斐大泉産は大型で黒色の無性系である。川はやや汚染しているが生息数は非常に豊富である。

山梨県甲斐小泉産は中型で黒色の有性系である。生息数は少ないが湧水のため汚染の心配がないので、清里産に代わる標準の虫に予定している。

奈良市春日大社産は中型で淡茶褐色の無性系の虫である。川は汚染が目立つが、生息数はかなり多い。

大阪府茨木市竜仙峡産は中型で濃茶褐色の無性系の虫であるが、今回は大型で茶褐色の有性系の虫も数匹見つかったので、両者の染色体を調べた。川はかなり汚染している。

大阪府千早川産は大型で茶褐色の有性系である。採集地点は上流で汚染は少ない。

兵庫県逆瀬川産は小型で濃茶褐色の無性系である。採集地点は中上流でやや汚染している。

兵庫県六甲産は大きさはいろいろで、体色も濃茶褐色、茶褐色、淡茶褐色など多様である。すべて無性系の虫である。川はかなり汚染している。今回は大型で濃茶褐色の虫を調べた。

佐賀県川上峡産は小型で濃茶褐色の無性系である。採集地点は下流でかなり汚染している。

なお、飼育水はすべて現地の水を使用した。

方法 染色体の観察には外科的切断による再生細胞を用いた。染色体標本は採集後2週間以内に次のよう

な“エアドライ法”により作成した。

1. 虫体をメスで3～4mm大に切断し、16～18℃で3日間現地の水で飼育する。
 2. 再生中の切断片を集めてメスで細切する。
 3. 0.075MのKCl (0.56g/100ml)を2～3ml加えて遠沈管に移し、ピペットで吸排出して単細胞状態にする。
 4. コルヒチン溶液 (1mg/10ml)をツベルクリン用注射針で2～3滴加えて室温で2時間放置後、37℃で30分間保温する。
 5. 800回転で10分間遠沈して上澄液を棄てる。
 6. 氷水で冷やしたカルノア液 (メチルアルコール30ml+氷酢酸10ml)を2～3ml加えて再懸濁し、氷水で10分間冷やす。
 7. 800回転で10分間遠沈して上澄液を棄てる。
 8. 氷水で冷やしたカルノア液を2～3ml加えて再懸濁し、氷水で30分間冷やす。
 9. 800回転で10分間遠沈して上澄液を棄てる。
 10. 氷水で冷やしたカルノア液を2～3ml加えて再懸濁し、氷水で30分間冷やす。
 11. 800回転で10分間遠沈して上澄液を棄てる。
 12. 氷水で冷やしたカルノア液を0.5～1ml加えて再懸濁し、氷水で冷やす。
 13. 50%メチルアルコールに浸けて冷蔵庫中で冷やしておいたスライドガラスをペーパータオルでふき取り、水平な台の上に置く。
 14. スライドガラスの中央に、約3cmの高さから細胞懸濁液を2～3滴落として、自然乾燥させる。
- 染色 メルク社のギムザ液10mlに125mlの蒸溜水と

Table 1 List of samples

Locality	Date	Mean length (mm)
Kiyosato	Sep.'72; Jun. '73; Apr. & Aug.'89	32 (38-22)
Kai-Oizumi	Apr. & Aug. '89	21 (30-15)
Kai-Koizumi	Aug. '89	16 (20-10)
Kasuga-Taisha	Feb. '88	18 (23-15)
Ryusenkyo	Aug. '80; May '88	16 ¹ (18-11), 22 ² (23-20)
Chihayagawa	May & Dec. '88	23 (33-16)
Sakasegawa	Jun. '89	13 (20-11)
Rokko	Jun. '89	26 (38-15)
Kawakamikyo	Mar. & Jul. '89	12 (19-8)

¹Asexual type, ²Sexual type

25mLのリン酸緩衝液 ($M/15$, pH6.8) を加えた液で10分間染色し、蒸留水で余分な染色液を洗い流したのち、自然乾燥させる。

結果および考察

核型分析は Table 2 に示したように相対長 (染色体長/総染色体長) $\times 1000$, 腕比 (長腕長/短腕長), 動原体指数 (短腕長/染色体長) $\times 100$, 腕比に基づくモード記号 (Levan *et al.*, 1964)¹⁰ を参考にしておこなった (Figs. 2-4)。

2n=16系 山梨県清里産, 山梨県甲斐小泉産, 奈良市春日大社産, 大阪府千早川産の虫は, 調査した個体すべてが染色体数 2n=16であった。大阪府茨木市竜仙峡産の前回1980年の調査⁸ では, 染色体数が 2n=16の個体は見られなかったが, 今回, 大型で茶褐色の虫は 2n=16であった。各地の虫の染色体数 2n=16の核型に差異はなかった。

Fig. 2 に清里産の中期分裂像と核型を示した。染色体数 2n=16は16Mで構成され, 第5染色体の長腕に付随体 (satellites) が観察されることがあった。

春日大社産は無性系の虫であり, 大阪府牛滝産⁵ も無性系の虫であるが染色体数は 2n=16であった。しかし, これらは例外的で, 染色体数 2n=16は有性系の虫に特有な染色体である。有性系の虫では 2n=16以外の異数体は全く観察されていない。

3n=24系 染色体数 3n=24に相当するものとしては沖・田村 (1975)⁶ の報告がある。彼らは1個体内

に染色体数16の細胞と染色体数24の細胞が混在する虫を見つけたが, “押しつぶし法” による標本で染色体像が不鮮明なため, 24の染色体が2倍体か3倍体か異数体かの正確な核型分析ができなかった。

最近まで染色体数 3n=24の虫は発見されていなかったが, 我々は山梨県甲斐大泉産の虫が 3n=24であることを発見し (Kato *et al.*, 1989)⁹, また今回, 兵庫県六甲産の大型で濃茶褐色の虫も 3n=24の染色体をもつことを確認した。

Fig. 3 は甲斐大泉産の中期分裂像と核型である。染色体数 3n=24は24Mで構成され, 第5染色体の長腕に付随体が観察されることがあった。

Fig. 3 と Fig. 2 の比較と, Table 2 の各項の比較から, 3n=24は2n=16から由来したことがわかる。その原因としては, 2nの生殖細胞が倍加して4nになり, 2nと4nの有性生殖で3n個体が誕生したか, あるいは, 2n同士の有性生殖で, 受精時に極体が放出されずに逆戻りして3n個体になったかのいずれかと考えられるが, この証明は不可能である。

これまで多くの虫について染色体調査がおこなわれたにもかかわらず, 永い間3n個体が発見されなかったのは, 各地に分散した3nの虫のほとんどが環境に適応できずに死滅し, 環境にうまく適応したものだけがわずかに生き残り, それらがたまたま我々によって発見されたものと思われる。

この偶然の発見は, 杉野 (1959³, 1971⁴) が以前から“九州型”とか“平地型”とか“汚水性”の虫と呼ん

Table 2 Comparison of karyotypes of three chromosome groups in *Dugesia japonica*

Chromosome No.	Relative length			Arm ratio			Centromeric index			Nomenclature		
	2n=16	3n=24	25+ α *	2n=16	3n=24	25+ α *	2n=16	3n=24	25+ α *	2n=16	3n=24	25+ α
1	192.3	192.3	189.6	1.2	1.2	1.1	45.2	46.1	47.1	M	M	M
2	152.1	149.8	151.5	1.1	1.2	1.2	46.9	46.3	46.1	M	M	M
3	133.9	137.5	137.8	1.1	1.1	1.1	47.5	48.1	47.6	M	M	M
4	123.9	128.9	127.2	1.5	1.6	1.6	39.3	38.6	40.8	M	M	M
5	113.9	114.6	115.9	1.5	1.5	1.4	40.0	39.6	42.0	M ^{sat}	M ^{sat}	M
6	102.0	99.0	100.5	1.1	1.2	1.3	46.6	45.3	43.5	M	M	M
7	94.0	92.4	92.4	1.0	1.0	1.0	50.0	50.0	50.0	M	M	M
8	87.9	85.5	85.1	1.2	1.1	1.2	46.4	49.1	45.2	M	M	M

M: metacentrics, sat: satellites

*: 25+ α =23M+1SM+1A+ α ; Measurement of extra chromosomes (1SM+1A+ α) are omitted.

SM: submetacentrics, A: acrocentrics, α : small acrocentrics (0 or 1 or 2)

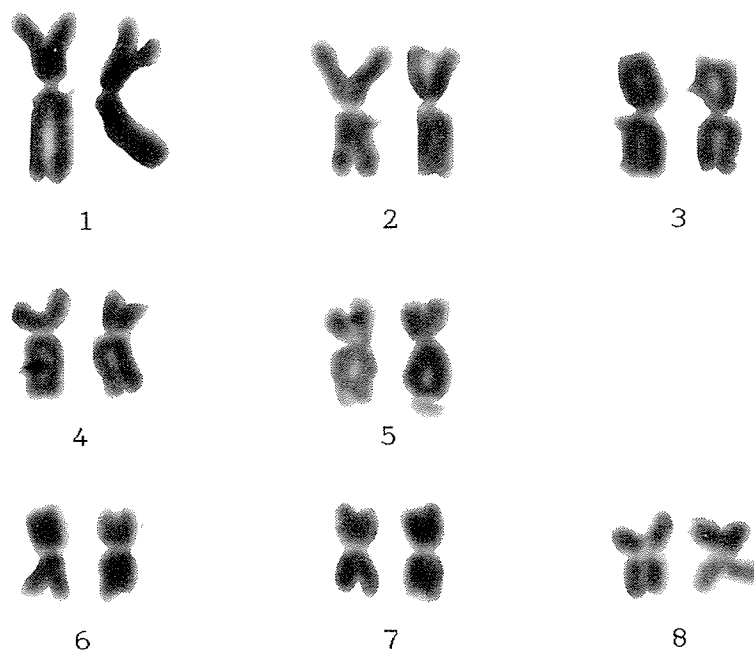
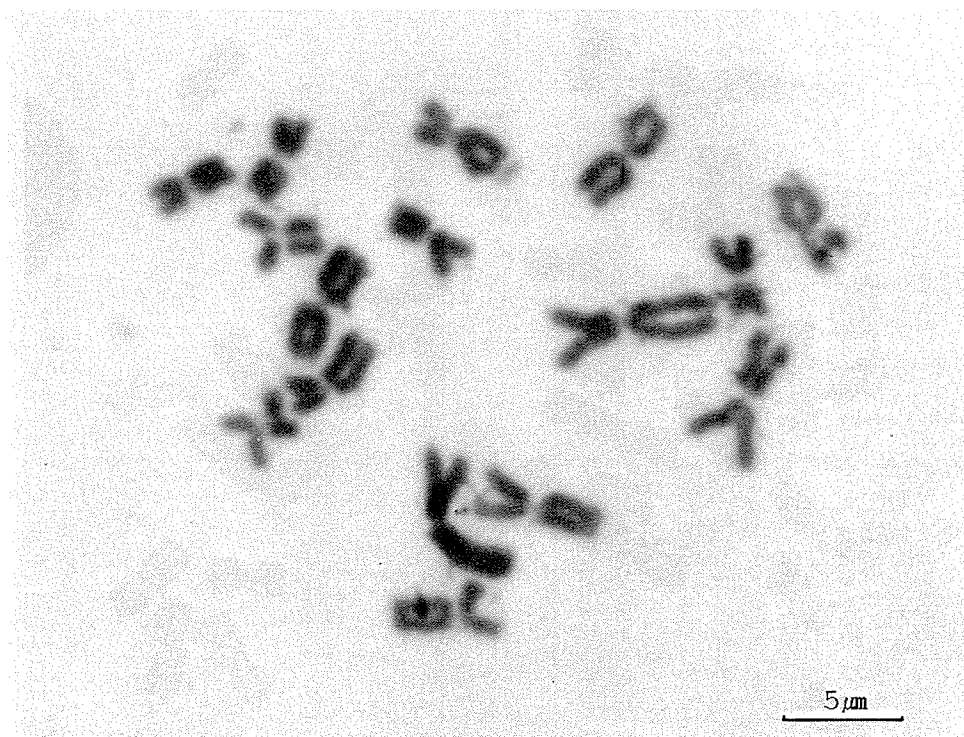


Fig. 2 A case of chromosome number $2n=16$ from Kiyosato. Top : Metaphase chromosome.
Bottom : Karyotype analysis, 16 (16M).

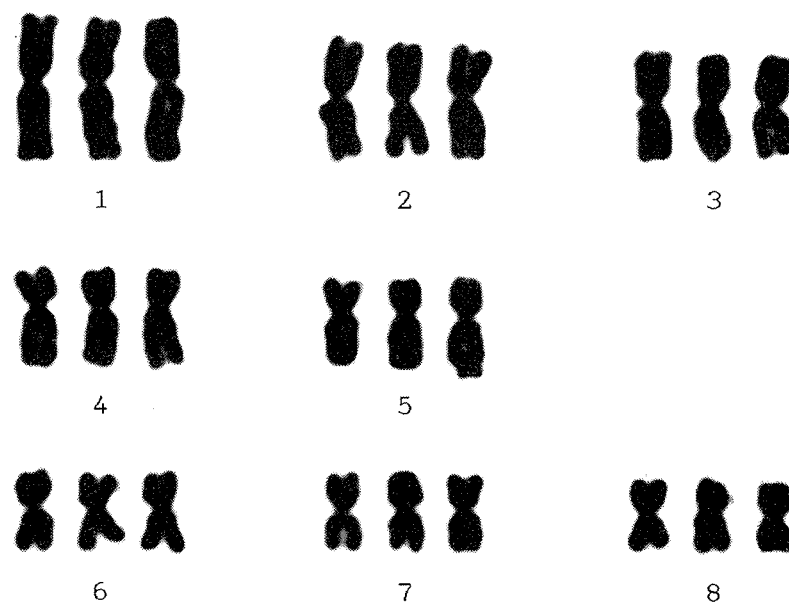
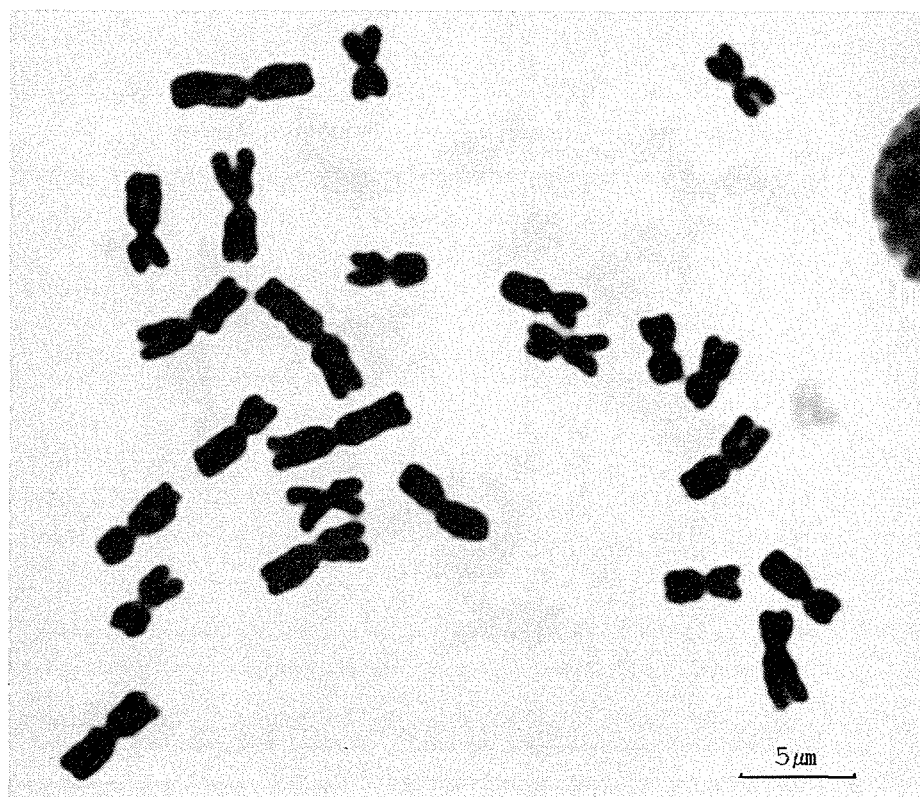


Fig. 3 A case of chromosome number $3n=24$ from Kai-Oizumi. Top : Metaphase chromosome. Bottom : Karyotype analysis, 24 (24M).

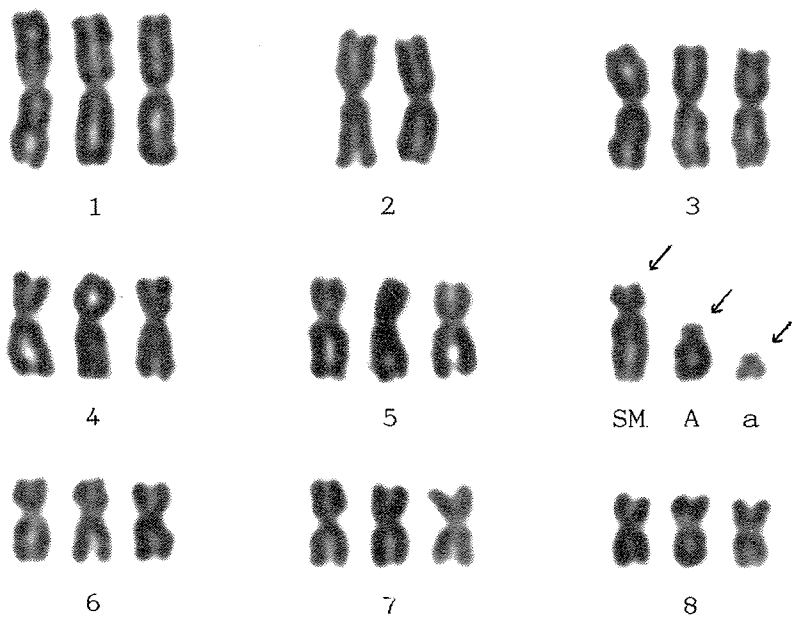
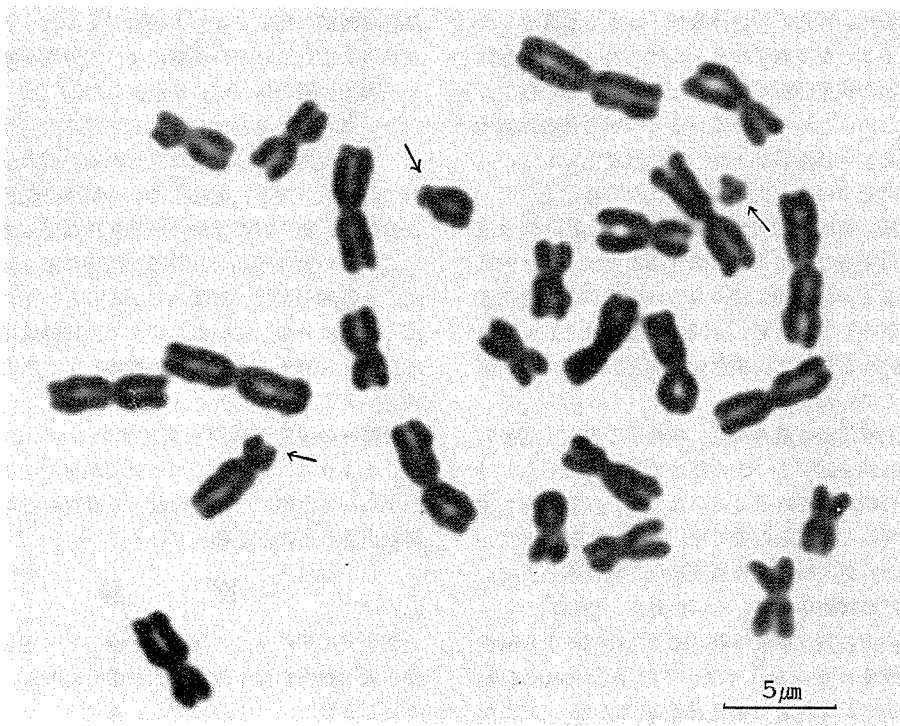


Fig. 4 A case of chromosome number 26 from Ryusenkyo. Top : Metaphase chromosome.
Bottom : Karyotype analysis, 26(23M+1SM+1A+1a). Arrows indicate extra chromosomes,
(1SM+1A+1a). M : metacentrics, SM : submetacentrics, A : acrocentrics, a : small acrocentrics.

でいた一群が、後述の染色体数 $25+\alpha$ をもつ確立した集団であることを証明するきっかけになった。染色体数 $3n=24$ の核型分析がなかったら、 $25+\alpha$ の核型分析もできなかったからである。 $3n=24$ の存在は基本型である $2n=16$ から $25+\alpha$ へ変化(進化)していった過程を考えるのに、大いに参考になった。

$25+\alpha$ 系 前回の1980年の調査⁸で、大阪府茨木市竜仙峡産の中型で濃茶褐色の無性系の虫は1個体内に染色体数 $2n=16$ と26と27の3つの細胞が1:2:3の割合で混在していたが、今回の調査では $2n=16$ の細胞が体内から消えて、染色体数26と27が4:3の割合で混在していた。

兵庫県逆瀬川産の濃茶褐色で無性系の虫は1個体内に染色体数25と26が1:1の割合で混在していた。

詳細な分析はまだ終了していないが、佐賀県川上峡産の濃茶褐色で無性系の虫では、染色体数25が確認された。また京都市鞍馬産の濃茶褐色で無性系の虫でも染色体数25が観察されている(杉野ら, 1973)⁵。

$25+\alpha$ の虫の基本染色体数は25で、 $23M+1SM+1A$ で構成されている。 α は小さな acrocentrics (a) で、これが0か1か2で染色体数が25か26か27になる。染色体数26は $23M+1SM+1A+1a$ で、染色体数27は $23M+1SM+1A+2a$ で構成されている。

Fig. 4 に竜仙峡産の染色体数26の中期分裂像と核型を示したが、これと Fig. 3 の $3n=24$ の核型を比較すると、 $3n=24$ では見られない Fig. 4 の extra 染色体を除いた染色体番号1~8に関しては、第2染色体の数が違うだけで同じ核型を示している。

染色体 $3n=24$ と染色体 $25+\alpha$ の違いは第2染色体と extra 染色体だけであるので、 $3n=24$ の第2染色体の3本のうち1本に切断が起こって extra 染色体ができて、 $25+\alpha$ になったと考えられる。ただし、厳密に測定すると、extra 染色体の全部の長さは第2染色体よりもやや長いので、第2染色体の切断以外の由来も考えなければならないが、第2染色体の長腕と extra 染色体のSMの長腕の長さが一致しているので、今回は染色体番号1~8にだけ注目して考察した。プラナリアの染色体でG-バンド染色が可能になったときに改めて厳密な分析をしたいと考えている。

$25+\alpha$ 系の誕生はかなり古い時代で、 $3n=24$ の誕生と同時にあったと考えられる。前述したように、基本型の $2n=16$ から $3n=24$ をもつ受精卵ができたとき、卵割の初期に第2染色体の1本に切断が起こり、

染色体数27($25+2a$)の細胞が生まれ、各地に勢力を拡大していったが、分裂によって仲間を増やしていく過程で小染色体(a)が消失して26($25+1a$)になり、さらに小染色体が消失して25になったと思われる。その根拠は、25の虫は見られるが27の虫は発見されていないことと、混在している個体の染色体数25:26の比率、26:27の比率の経時変移などである。

この系の虫の共通した特徴は汚染に強く、濃茶褐色で、比較的小型で、無性系であることの4つである。広く各地に分布しているが同じ染色体構成($25+\alpha=23M+1SM+1A+\alpha$)を維持している安定した集団といえる。

分類への提言 鮮明な染色体像による核型分析から、ナミウズムシには3つの集団が存在することが明らかになったので、今回の我々の資料を参考に分類が再検討されることを願っている。

謝 辞

本研究にあたり、ご指導とご協力を下さった武庫川女子大学動物心理学教室の広瀬栄治教授に、厚く感謝いたします。

文 献

1. 手代木 渉: “プラナリアの生物学”, 共立出版, 東京, 1987, pp. 10-28.
2. 手代木 渉・板垣源太郎: 動物学雑誌 74: 38-45 (1965).
3. 杉野 久雄: 動物学雑誌 68: 46 (1959).
4. 杉野 久雄: プラナリアの採集・飼育・実験, 杉野教授記念誌, 渦虫論文集: 1-16 (1971).
5. 杉野 久雄・広瀬 栄治・加藤 文裕: Nature Study 19: 5-7 (1973).
6. 沖 岩四郎・田村 幸子: 動物学雑誌 84: 61-63 (1975).
7. Kawakatsu, M., Oki, I., Tamura, S., and Sugino, H.: Bull. Fuji Women's College 14: 81-126 (1976).
8. Kato, F.: Bull. Mukogawa Women's Univ. 28: 49-56 (1980).
9. Kato, F., Ojima, Y., and Shirai, M.: CIS (in press) (1989).
10. Levan, A., Fredga, K., and Sandberg, A. A.: Hereditas 52: 210-220 (1964).

(1989年9月27日受理)